

## НАРУШЕНИЕ NO-ЗАВИСИМОГО МЕХАНИЗМА СОСУДИСТОЙ РЕАКТИВНОСТИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Присяжная А.Д., Ткаченко М.Н., Коцюруба А.В., Сагач В.Ф.

*Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев*

The purpose of our work was to study the abnormalities of endothelium-dependent reactions and the influence of antioxidants introduction on such disorders at experimental diabetes. The investigations were conducted on rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus (type I). The level of blood glucose at rats with diabetes made  $21,1 \pm 6,7$  mM/l (at control group  $6,4 \pm 0,6$  mM/l). Is shown, that at diabetes mellitus are impaired, mainly, endothelium-dependent reactions, whereas endothelium-independent dilatation remain. It is known, that at diabetes mellitus oxidative stress develops. Taking into account a possible role of such infringements in development of endothelial dysfunction, was carried out some series of experiments with introduction of known antioxidants - melatonin and water-soluble vitamin E – trolox to rats with experimental diabetes and control animal. The preparations introduced *in vitro*, *in vivo*, and *per os*. The preparations did not render essential influence on endothelium-dependent reactions of control group and on the level of blood glucose of both groups. At the same time, the preparations rendered the positive influence on the function of endothelium at any way of introduction at rats with experimental diabetes. Thus, at diabetes mellitus the infringements of endothelial function are observed. The application of antioxidants reduces endothelial dysfunction at diabetes mellitus. Such infringements of vascular reactivity, probably, may cause the development of diabetic angiopathy at diabetes mellitus type I.

Проблема сахарного диабета – одна из самых актуальных в современной эндокринологии. Это обусловлено не только неуклонно увеличивающимся количеством больных диабетом, но и высокой частотой сердечно-сосудистых осложнений при этом заболевании [3, 5]. До 80% всех случаев смерти диабетических больных обусловлены патологией сердечно-сосудистой системы. В соответствии с исследованиями последних лет, в нарушении реактивности сосудов при диабете определяющую роль играет дисфункция эндотелия [3, 4, 5]. В основе механизма глюкозотоксичности лежит выработка избыточного количества свободных кислородных радикалов, что приводит к развитию оксидативного стресса с последующим нарушением множества клеточных функций. Целью нашей работы было исследование реактивности

сосудистых препаратов аорты, измерение метаболитов оксида азота и активности NO-синтаз при экспериментальном сахарном диабете, а также изучение показателей оксидативного стресса и влияния антиоксидантов на эндотелиальную дисфункцию.

#### *Материалы и методы исследований*

Исследования были проведены на модели стрептозотининдуцированного сахарного диабета. Для этого крысам-самцам линии Вистар-Киото в возрасте 4 мес и массой 200-250 г был введен внутривенно стрептозотинин ("Sigma", США) из расчёта 50 мг/кг. В опыт брали животных через 10 - 12 недель после введения препарата. Контроль глюкозы крови осуществляли при помощи глюкометра "Медисенс" ("Abbott", США). Уровень глюкозы крови у диабетических крыс составлял  $21,1 \pm 6,7$  ммоль/л (у контрольной группы  $6,4 \pm 0,6$  ммоль/л). В качестве антиоксидантов использовали препараты мелатонин ("Sigma", США) и водорастворимый витамин Е – тролокс ("Aldrich", США). Мелатонин применяли *in vitro* (добавление к перфузирующему раствору в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М/л) и *in vivo* (внутрибрюшинное введение в дозе 10 мг/кг за 60 минут до начала эксперимента). Тролокс применяли *in vitro* (в концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М/л), *in vivo* (в дозе 10 мг/кг за 60 минут до начала эксперимента), а также *per os* (7-8 мг/кг за 60 минут до начала эксперимента).

Сосудистые реакции исследовали на изолированных препаратах грудного отдела аорты. Для исследования аорту нарезали на сегменты шириной 1,5-2 мм и массой 2-2,5 мг с учётом циркулярной ориентации гладкомышечного слоя. Кольцевой препарат для исследования помещали в проточную термостатированную ( $36-36,5^{\circ}$  С) камеру объёмом 1 мл<sup>3</sup>, в которой препарат подвергали пассивному растяжению силой 7-10 мН и выдерживали в течение 30 минут в модифицированном растворе Кребса. Активации гладких мышц достигали добавлением к буферному раствору норадреналина ("Sigma", США) в концентрации  $10^{-5}$  М/л. Сократительную активность аорты регистрировали в режиме, приближенном к изометрическому, при помощи механоэлектрического преобразователя 6MX1C. Для исследования эндотелийзависимых и эндотелийнезависимых реакций гладких мышц регистрировали изменения их тонического напряжения на агонист мускариновых рецепторов ацетилхолин ("Fluka", Швеция) в концентрации  $10^{-6}$  М/л либо донор NO - нитропруссид натрия ("Sigma", США) в концентрации  $10^{-4}$  М/л. Амплитуду изменения тонического напряжения ГМ при добавлении к раствору ацетилхолина гидрохлорида или нитропрussa натрия рассчитывали в процентах от уровня их стойкого сокращения ("плато").

В гомогенатах сердца и аорты крыс с экспериментальным диабетом и контрольных животных определяли содержание стабильного метаболита

NO - нитрит-аниона ( $\text{NO}_2^-$ ) и диеновых конъюгат, а также активность конститутивной (cNOS) NO-синтазы [1].

### *Результаты и их обсуждение*

Преактивированные норадреналином кольцевые препараты аорты контрольных крыс всегда реагировали расслаблением на добавление к перфузирующему раствору ацетилхолина, причём величина такого расслабления составляла  $103,8 \pm 6,7\%$ . Эндотелийзависимая релаксация сосудистых гладких мышц аорты диабетических животных была снижена и составляла в среднем  $22,4 \pm 7,4\%$ . Эндотелийнезависимые реакции у диабетических животных не имели существенных отличий от таковых у контрольных животных и составляли  $134,3 \pm 11,5\%$  (у контрольных -  $149,27 \pm 20\%$ ). Таким образом, при экспериментальном сахарном диабете нарушаются эндотелийзависимые реакции, в то время как эндотелийнезависимые реакции остаются неповреждёнными. Это свидетельствует о развитии дисфункции эндотелия при данной патологии. Изучение биохимических характеристик функциональной активности системы оксида азота указывает на уменьшение содержания нитрит-аниона с  $454,44 \pm 41,55$  пмоль/мг белка до  $43,28 \pm 10,65$  пмоль/мг белка в сердце и с  $341,43 \pm 53,61$  пмоль/мг белка до  $235,88 \pm 40,09$  пмоль/мг белка в аорте. При этом наблюдается снижение активности конститутивной NO-синтазы в сердце с  $56 \pm 6,22$  пмоль/мин\*мг белка до  $4,38 \pm 0,15$  пмоль/мин\*мг белка, а в аорте с  $329,92 \pm 34,17$  пмоль/мин\*мг белка до  $95,83 \pm 12,56$  пмоль/мин\*мг белка. Эти данные указывают на NO-зависимую природу нарушений функции эндотелия.

Измерение уровня диеновых конъюгат – маркера оксидативного стресса - показало рост их содержания при сахарном диабете как в сердце (с  $3,26 \pm 0,49$  нг/мг белка до  $32,07 \pm 1,71$  нг/мг белка), так и в аорте (с  $7,42 \pm 0,94$  нг/мг белка до  $24,77 \pm 3,56$  нг/мг белка).

Одним из возможных механизмов развития эндотелиальной дисфункции при экспериментальном сахарном диабете является оксидативный стресс [2, 4, 6]. Для оценки этой гипотезы были проведены эксперименты с введением как контрольным, так и диабетическим животным антиоксидантов – мелатонина и тролокса. Следует заметить, что препараты не влияли на средний уровень глюкозы крови животных. Оба препарата при всех путях введения не оказывали значимого влияния на сосудистые реакции контрольных крыс. Введение же антиоксидантов диабетическим животным существенно улучшало нарушенную функцию эндотелия. При введении *in vitro* мелатонин восстанавливал эндотелийзависимое расслабление сосудистых гладких мышц аорты диабетических крыс до  $87,4 \pm 11,8 \%$ , а тролокс – до  $70,9 \pm 10,5 \%$ . Введение мелатонина *in vivo* увеличивало вазодилатацию до  $81,8 \pm 9 \%$ , тролокса – до  $58,2 \pm 8,8 \%$ , а введение тролокса *per os* соответственно до

70,7 ± 8 %. Таким образом, получены данные указывающие на существенную эффективность применения антиоксидантов с целью восстановления функции эндотелия при экспериментальном сахарном диабете.

#### *Литература*

1. Сагач В.Ф., Ткаченко М.Н., Присяжная А.Д. и др. Изменения вазодилататорных реакций сосудистых гладких мышц и системы оксида азота при экспериментальном сахарном диабете // Физиологический журнал. – 2003. – 49, № 4. – С. 24 – 32.
2. Bonnefont-Rousselot D., Bastard J.P., Jaudon M.C. et al. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance // Diabet Metab – 2000. – 26, № 3. – P. 163 – 176.
3. Cosentino F., Luscher T.F. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus // J Cardiovasc Pharmacol – 1998. – 32, № 3. – P. 54 – 61.
4. Hink U., Li H., Mollnau H. et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus // Circ Res – 2001. – 88, № 2. – P.14-22.
5. Pieper G.M. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction // Hypertension – 1998. – 31, № 5.- P.1047 – 1060.
7. West I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes // Diabetic Medicine – 2000. – 17, № 3. - P. 171 – 180.

### **НЕКОТОРЫЕ СЛЕДСТВИЯ МЕХАНИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА ЭНДОТЕЛИЙ**

**Родионов Ю.Я., Шебеко В.И., Науменко А.А., Яхновец А.А.**

*Государственный медицинский университет, г. Витебск*

One of very intriguing peculiarity of endothelium is an ability to perceive mechanical (and acoustic) stimulation. Indeed, since the embryonic heart cells starts beating on very early stages of embryogenesis are appearing of pulsatile nature of blood flow and endotheliocytes expose to biomechanical stimulations. These biomechanical stimulations has retained during the whole life of animal organisms. Therefore the endothelium can be considered as a biomechanical sensor (transducer). The endothelium percept first of all influences of “shear stress” blood flow in laminary and turbulency flow.

The action of the law continuity flow under periodic blood flow excitations by cardiac impulses, leads to the formation and maintenance of a rotational flow component in the circulatory system, because of the fact that the heart induces a rotational screw asymmetry in the blood stream and also